

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Pankaj PANWAR**

Thèse dirigée par **Eva PEBAY-PEYROULA**

Préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## Relations structure – fonction des transporteurs nucléotides

Thèse soutenue publiquement le **26 janvier 2012**,  
devant le jury composé de :

**Bruno MIROUX**

Directeur de recherche, Paris, rapporteur

**Jean-Jacques LACAPÈRE**

Directeur de recherche, Paris, rapporteur

**Andrea DESSEN**

Directrice de recherche, Grenoble, Présidente

**François DEHEZ**

Chargé de recherche, Nancy, Examineur

**Norbert ROLLAND**

Directeur de recherche, Grenoble, Examineur

**M.R.N MURTHY**

Professeur, India, Examineur

**Eva PEBAY-PEYROULA**

Professeur, Grenoble, Directrice de thèse



# Contents

<b>Contents</b>	<b>i</b>
<b>Abbreviations</b>	<b>vi</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Transport across biological membranes . . . . .	1
1.1.1 Principle of membrane transport . . . . .	2
1.2 Adenine nucleotide transport . . . . .	5
1.2.1 Mitochondrial localized adenylate transporters . . . . .	7
1.2.2 Adenylate transporters in chloroplast . . . . .	9
1.3 Mitochondrial AAC . . . . .	11
1.3.1 Physiological role and location of the carrier . . . . .	11
1.3.2 Structure of carrier . . . . .	12
1.3.3 Inhibitors of the carrier . . . . .	14
1.3.4 Transport mechanism . . . . .	14
1.3.5 Oligomeric status and transport mechanisms . . . . .	16
1.4 Chloroplast ATP/ADP carrier - NTT1 . . . . .	17
1.4.1 Physiological role of the carrier . . . . .	18
1.4.2 Isoforms of the carrier . . . . .	20
1.4.3 Homologues in other organisms . . . . .	21
1.4.4 Characteristics of transport . . . . .	23
1.5 Mitochondrial AAC v/s chloroplast NTT . . . . .	24

---

1.5.1	Functional differences in context of physiological demands . . . . .	25
1.5.2	Evolution of nucleotide carriers . . . . .	27
1.6	Crystallographic studies on membrane transporter . . . . .	27
1.6.1	Difficulties associated with membrane proteins . . . . .	28
1.6.1.1	Production of membrane proteins . . . . .	28
1.6.1.2	Purification and homogenous preparation . . . . .	29
1.6.1.3	Crystallization and structure determination of membrane proteins . . . . .	30
1.6.2	Curious case of detergents . . . . .	30
1.6.3	Lipidic mesophase (LMP) for membrane protein crystallization . . . . .	31
1.6.4	Beyond X-ray crystallography . . . . .	34
1.6.5	MD simulations and docking . . . . .	35
1.6.6	Structural themes of TM transporters . . . . .	36
1.7	Objective of the thesis . . . . .	36
<b>2</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>39</b>
2.1	Production of NTT1 . . . . .	39
2.1.1	Overexpression . . . . .	39
2.1.2	Membrane preparation . . . . .	40
2.1.3	Quantification of total protein . . . . .	40
2.1.4	Solubilization . . . . .	41
2.2	Purification and characterization of NTT1 . . . . .	41
2.2.1	Affinity chromatography . . . . .	41
2.2.2	Size exclusion chromatography . . . . .	42
2.2.3	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) . . . . .	42
2.2.4	Western Blot detection . . . . .	43
2.2.5	Silver staining . . . . .	44
2.2.6	Negative stain Electron microscopy . . . . .	44

---

2.3	Crystallization of NTT1 . . . . .	45
2.3.1	Crystallization and data collection . . . . .	45
2.3.2	Quantification of detergent by FTIR . . . . .	45
2.4	Structure determination of Streptavidin . . . . .	46
2.4.1	Purification . . . . .	46
2.4.2	Crystallization . . . . .	46
2.4.3	Data collection and processing . . . . .	47
2.4.4	Model building and refinement . . . . .	47
2.5	Virtual screening for novel mitochondrial AAC Inhibitors . . . . .	48
2.5.1	Ligand selection . . . . .	48
2.5.2	Molecular docking . . . . .	49
2.5.3	Uptake studies with radiolabelled ATP . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Results</b>	<b>52</b>
3.1	Towards understanding of NTT1 structure and function . . . . .	52
3.1.1	Expression . . . . .	52
3.1.2	Solubilization . . . . .	53
3.1.3	Initial purification protocol . . . . .	53
3.1.3.1	Cleavage of His-tag . . . . .	55
3.1.4	Modification in the purification protocol . . . . .	58
3.1.4.1	Modification of the purification sequence . . . . .	59
3.1.4.2	Modification with Ni-NTA chromatography . . . . .	59
3.1.5	Size exclusion chromatography (SEC) . . . . .	64
3.1.5.1	Large scale purification . . . . .	68
3.1.6	Characterization of protein homogeneity . . . . .	69
3.1.6.1	Negative staining EM . . . . .	69
3.1.7	Initial Crystallization and data collection . . . . .	70
3.1.8	Quantification of detergents by FT-IR . . . . .	70
3.1.8.1	Optimization of detergent quantity . . . . .	75
3.1.9	Latest trials of crystal optimization . . . . .	76
3.1.10	Stability profiling of NTT1 using thermal denaturation . . . . .	77

---

3.2	New inhibitors for mitochondrial ADP/ATP Carrier . . . . .	79
3.2.1	Virtual screening - computational quirk or useful tool?	80
3.2.2	Glide as a tool for molecular docking . . . . .	82
3.2.2.1	XP v/s SP docking mode . . . . .	84
3.2.3	Known inhibitors and validation of docking method	85
3.2.3.1	Binding of known inhibitors . . . . .	85
3.2.4	Docking of CATR to the AAC . . . . .	87
3.2.5	Test with reference compounds . . . . .	89
3.2.6	Classification of docked ligands . . . . .	90
3.2.6.1	Interaction fingerprint based analysis of docking results . . . . .	90
3.2.6.2	Identification of key interactions . . . . .	93
3.2.7	Functional tests with top-scoring compounds . . . . .	94
3.2.8	New ADP analogues for transport studies . . . . .	96
3.2.8.1	ADP binding to AAC . . . . .	96
3.2.8.2	Docking with ADP analogues . . . . .	98
3.2.8.3	Functional tests with ADP analogues . . . . .	99
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>102</b>
4.1	Towards understanding of NTT1 structure and function . . .	102
4.1.1	NTT1 production for structural studies . . . . .	102
4.1.2	Homogeneity and crystallization . . . . .	103
4.1.3	Role of detergent in crystallization . . . . .	104
4.2	New inhibitors for mitochondrial AAC . . . . .	105
4.2.1	Need for new inhibitors . . . . .	105
4.2.2	Possible binding mode of C-15 . . . . .	106
4.2.3	Binding of ADP analogues to AAC . . . . .	106
4.2.4	Correlation between Gscore and experimental observations . . . . .	107
4.3	Connecting link between AAC and NTT1 . . . . .	110
4.3.1	Functional mechanism . . . . .	110

---

4.3.2	Structural correlation . . . . .	112
<b>5</b>	<b>Conclusions and perspectives</b>	<b>113</b>
	<b>Annexes</b>	<b>114</b>
<b>A</b>	<b>Contamination from affinity column: Encounter with a new villain in the world of membrane protein crystallization</b>	<b>115</b>
A.1	Introduction . . . . .	116
A.2	Methods . . . . .	118
A.2.1	Expression and purification of NTT1 . . . . .	118
A.2.2	Crystallization, data collection and structure determination . . . . .	119
A.2.3	Detergent elution of engineered streptavidin from <i>Strep-Tactin</i> <sup>®</sup> . . . . .	119
A.3	Results and discussion . . . . .	120
A.3.1	Purification and crystallization . . . . .	120
A.3.2	Structure of the engineered streptavidin bound to desthiobiotin . . . . .	121
A.3.3	Elution of streptavidin from <i>Strep-Tactin</i> <sup>®</sup> matrix . . . . .	122
A.4	Conclusions and perspectives . . . . .	124
A.5	Figure legends . . . . .	128
<b>B</b>	<b>Plasmid and NTT1 gene construct</b>	<b>130</b>
B.1	NTT1 protein sequence . . . . .	136
B.2	List of detergents used during experiments . . . . .	138
B.3	Isolation and purification of thylakoid lipids . . . . .	139
	<b>Bibliography</b>	<b>141</b>

# Abbreviations

AAC.....	ADP/ATP carrier
ADP.....	Adenosine diphosphate
AMP.....	Adenosine monophosphate
ATP.....	Adenosine triphosphate
BM .....	Bongkreikic acid
CATR .....	Carboxyatractyloside
CMC .....	Critical micellar concentration
EM .....	Electron microscope
GTP .....	Guanosine triphosphate
IMS .....	Intermembrane space
LCP .....	Lipid cubic phase
LMP .....	Lipid mesophase
Mant-ADP .....	3-O'-N-methylanthraniloyl-ADP
MD .....	Molecular dynamic
N-ADP .....	3-O'-naphthoyl-ADP
N-ATP .....	3-O'-naphthoyl-ATP
NMR .....	Nuclear magnetic resonance
NTT1.....	Nucleotide transporter1
PDC.....	Protein-detergent complex
TM .....	Transmembrane
VDAC .....	Voltage dependent anionic channel

## Résumé du chapitre 1

L'objectif principal de ma thèse était l'étude structurelle et fonctionnelle de protéines de transport de nucléotides en étudiant deux transporteurs différents. Le NTT1 chloroplaste, catalyse l'échange d'ATP électroneutre dans le cytosol avec l'ADP et le Pi dans le stroma. La séquence d'acide aminé de NTT1 présente un degré élevé de similitude avec le transporteur ATP/ADP de la bactérie *Rickettsia prowazekii* ou *Chlamydia trachomatis*. Une autre classe importante de transporteur de nucléotides, choisie dans la présente étude est AAC mitochondriale. Le transporteur est un constituant majeur et essentiel de la membrane mitochondriale interne. AAC est responsable de l'importation de l'ADP et de l'exportation de l'ATP néo-synthétisé. Des différences importantes au niveau phylogénétique et fonctionnelle ont été rapportées pour AAC et NTT1. Les études comparatives fonctionnelles et structurelles de ces transporteurs seraient bénéfiques pour notre compréhension fondamentale des processus de transport de nucléotides et pourrait permettre le développement de médicament efficace contre les bactéries pathogènes.

Dans un effort pour comprendre et analyser le rôle de NTT1 dans le transport des nucléotides, la détermination de sa structure cristalline est une étape essentielle. Comme pré-requis pour la cristallisation, la purification et l'expression de protéine fonctionnelle sont nécessaires. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont présentés dans la section 3.1.6. Quand j'ai commencé le doctorat, Aurélien Deniaud, un post-doc de l'équipe, a lancé la production et la caractérisation des NTT1. J'ai travaillé avec lui pendant un an (Deniaud et al., Soumis), puis amélioré les protocoles et de caractérisation. La cristallisation des protéines membranaires requiert une connaissance approfondie des interactions protéine-détergent et ses caractérisations. Nos premiers essais de cristallisations ont entraînés l'obtention de cristaux qui sont bien formés et diffractent bien. Néanmoins, j'ai résolu la structure, qui est le premier du mutant triple de streptavidine



conçu pour se lier Strep-tag II, dans un complexe avec la desthiobiotine. Le manuscrit en annexe décrivant ce travail sera soumis prochainement. La caractérisation des complexes protéines-détergents par des techniques biochimiques et biophysiques fournis des informations précieuses sur la stabilité des protéines, l'homogénéité et cette information peut mener à la réussite de la cristallisation de la protéine. Les essais de cristallisation et les caractérisations biophysique associés sont discutés et présentés dans la section 3.1.7.

La structure des AAC mitochondriaux liés à l'inhibiteur CATR disponible fournis un outil précieux pour comprendre le processus de transport des nucléotides. Toutefois, d'autres données structurales (structure d'une autre conformation) sont nécessaires pour déchiffrer l'ensemble du mécanisme de transport et de comprendre la spécificité des transporteurs. Comme outil pour obtenir de nouvelles structures de protéine-ligand, le criblage de composés qui pourraient potentiellement se lier avec son AAC est nécessaire. La recherche de petites molécules inhibitrices couplées à une validation fonctionnelle pourrait fournir des ligands intéressants, qui peuvent stabiliser l'AAC dans des états intermédiaires importants impliqués dans la fonction de transport. Ces objectifs constituent la deuxième partie de mon travail. La stratégie utilisée dans ce contexte et les résultats obtenus est présentée dans la section 3.2.

## **Résumé du chapitre 2**

### **2.1 Production de NTT1**

- 2.1.1 Sur-expression
- 2.1.2 Préparation de membrane
- 2.1.3 Quantification de la concentration de protéines totales
- 2.1.4 Solubilisations

### **2.2 Purification et caractérisation de NTT1**

- 2.2.1 Chromatographie d'affinité
- 2.2.2 Chromatographie d'exclusion
- 2.2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate de sodium
- 2.2.4 Détection par Western Blot
- 2.2.5 Coloration à l'argent
- 2.2.6 Microscopie électronique à coloration négatif

### **2.3 La cristallisation de NTT1**

- 2.3.1 Cristallisation et collecte de données
- 2.3.2 Quantification des détergents par FTIR
- 2.4 Détermination de la structure de la streptavidine
  - 2.4.1 Purification
  - 2.4.2 Cristallisation
  - 2.4.3 Collecte et traitement des données
  - 2.4.4 Construction du modèle et raffinement

## **2.5 Criblage virtuel pour de nouveaux inhibiteurs mitochondriaux AAC**

2.5.1 Choix des ligands

2.5.2 Docking moléculaire

2.5.3 Etude des interactions des ligands

## Résumé du chapitre 3

### Production, caractérisation et cristallisation de NTT1

La protéine NTT1 a pu être exprimée et produite dans *E. coli*. Plusieurs détergents ont été testés pour extraire la protéine des membranes. Les rendements étaient les meilleurs avec le LAPAO qui a été sélectionné pour la purification. Un premier protocole de purification a donné lieu à la présence d'un contaminant présent en très faible quantité et donc difficilement détectable. Ce contaminant, la streptavidine, a été cristallisé par erreur et sa structure a pu être résolue à haute résolution. Un nouveau protocole de purification a ensuite été développé. Il a permis l'obtention d'une protéine suffisamment pure et une chromatographie par filtration sur gel a permis de séparer deux fractions, l'une majoritairement monomérique et l'autre plutôt dimérique comme indiqué par les analyses en microscopie électronique. La fraction monomérique a conduit à des petits cristaux diffractant à 10 Å. Afin d'assurer la reproductibilité des conditions de cristallisation, plusieurs analyses permettant la caractérisation de la solution de protéines purifiées ont été mises au point. Parmi celles-ci, l'absorption IR par transformée de Fourier a permis de quantifier la quantité de détergent présente dans la solution, donnée essentielle pour la cristallisation. Cette quantité a pu ensuite être suivie en fonction des étapes de purification et un nouveau protocole a permis d'optimiser cette quantité. Plus récemment, une approche permettant de contrôler la stabilité thermique de la protéine a été explorée.

### Nouveaux inhibiteurs de AAC

Une approche de docking moléculaire basée sur le programme Glide a été mise en place. Elle a permis d'explorer plusieurs millions de molécules de la base ZINC. Plusieurs filtres et des scores basés sur des énergies ont permis de restreindre le nombre de molécules et d'en sélectionner quelques

dizaines. La méthode a été testée sur les inhibiteurs d'AAC ainsi que des dérivés d'ADP connus pour se lier à AAC sans être transportés. En particulier la localisation de l'inhibiteur CATR connue expérimentalement car présent dans la structure résolue par cristallographie, a été retrouvée validant ainsi cette approche. Les meilleurs composés identifiés par cette approche numérique ont ensuite été testés expérimentalement. L'un d'entre eux, noté C15, inhibe à plus de 60% le transport.

## Résumé du chapitre 4

### Études structurales de NTT1

Le protocole mis au point durant le travail de thèse et présenté dans le chapitre 3 a permis d'obtenir des premiers cristaux. Les études ont mis en évidence l'importance de l'homogénéité de la solution de protéine avant cristallisation. En particulier, la sélection de la fraction majoritairement monomérique est un des points clés. Par ailleurs, le choix du détergent pour la solubilisation et la purification est connu pour être un des paramètres critiques en cours de cristallisation. Un premier détergent, le LAPAO, semble être le meilleur pour la solubilisation, d'autres pourraient être explorés pour la cristallisation après échange lors de la purification. La quantité de détergent présente dans la solution, et plus exactement le rapport protéine/détergent est également un facteur déterminant. Les méthodes mises en place permettront pour les études futures de suivre ce paramètre et donc de le contrôler lors de la mise au point des protocoles.

### Nouveaux inhibiteurs d'AAC

Afin de comprendre le mécanisme de transport au niveau moléculaire, les structures de plusieurs conformations d'AAC sont nécessaires. L'identification de nouveaux inhibiteurs pourra permettre de bloquer d'autres conformations du transporteur et ainsi permettre leur cristallisation. Ces nouveaux inhibiteurs seront donc des outils pour explorer l'espace conformationnel d'AAC. Le mode de liaison du composé C15 présente des analogies avec celui de CATR, néanmoins la molécule C15 est plus petite que CATR. Parmi les analogues d'ADP inhibant AAC, nous avons identifié la molécule AP5, un inhibiteur de kinase. À ce stade, même si les molécules identifiées par docking présentent des taux d'inhibition plus ou moins forts, il a été difficile de faire une corrélation directe entre taux d'inhibition expérimental et

le score obtenu par les simulations numériques. Celles-ci devront donc être affinées en prenant en compte des facteurs plus fins comme l'intervention de molécules d'eau dans la liaison des inhibiteurs.

## **Comparaison NNT1 et AAC**

D'après l'analyse des séquences en acides aminés les structures globales des deux transporteurs sont probablement différentes, avec 6 hélices transmembranaires connues pour AAC et 11 à 12 prédites pour NTT1. Les mécanismes de transport diffèrent aussi, électrogénique pour AAC, neutre pour NTT1. Néanmoins, la comparaison des taux d'inhibitions de certains composés identifiés par docking pour AAC et testés expérimentalement pour AAC et NTT1 montre quelques analogies. Lorsque la structure de NTT1 sera connue, il sera donc très intéressant de pouvoir comparer les sites de fixation des nucléotides.

## Résumé du chapitre 5

Dans cette étude, nous avons conçu et réalisé un protocole pour l'expression, la purification et la cristallisation de NTT1, qui est une protéine membranaire intégrale. Le rôle significatif de NTTI comme transporteur ATP/ADP et son homologie étroite avec les transporteurs des bactéries pathogènes rend NTT1 une cible intéressante à étudier. Un protocole pour la purification de NTT1 a été optimisé, ce qui est compatible avec les études structurales. Une caractérisation plus poussée des protéines par SEC et par EM avec coloration négative, montre une homogénéité significative dans la préparation, ce qui est idéal pour les études structurales.

La pureté et l'homogénéité des protéines nous ont permis d'identifier les conditions de cristallisation de NTT1. La cristallisation des protéines membranaires exige un équilibre délicat entre la protéine et le contenu de détergent dans la solution de cristallisation. Nous avons adopté pour une stratégie de quantification de détergents dans la solution de cristallisation de NTT1 et développé une méthode pour réduire la quantité de détergent dans la solution après concentration de la protéine. Plusieurs additifs de cristallisation pourraient être explorées, telles que les dérivés de nucléotides ou de lipides chloroplastiques. Plusieurs optimisations des conditions de cristallisation permettent de se rapprocher de la détermination de la structure de NTT1. Grâce à l'obtention de milligrammes de NTT1 purifiée et à l'identification des conditions de cristallisation, il sera possible d'étudier la structure et la dynamique NTT1 entière, ce qui améliorera la compréhension du mécanisme de transport de nucléotides.

Pour développer la compréhension générale du transport de nucléotides, un autre transporteur de nucléotides d'AAC mitochondrial a été choisi pour les études. Le criblage virtuel de 'druglike subset' dans la base de données publique ZINC a été réalisée pour rechercher des inhibiteurs de l'activité biologique des mitochondries AAC. L'applicabilité de la procédure d'amarrage a été validé en comparant la liaison Glide pose de CATR avec la structure



cristalline. Les structures de Glide reproduit ainsi les géométries prévues du complexe. Après le criblage virtuel, les complexes pour les 500 premières du classement des composés ont été inspectés visuellement et 23 composés ont été achetés. Un composé a été livré en quantité insuffisante. Enfin, 22 composés ont été testés in vivo de l'inhibition de l'ATP de transport par l'AAC. Notamment, quatre des 22 composés ont montrés plus de 40% d'inhibition lorsqu'ils sont appliqués à une concentration de 100  $\mu$ M.

Un des composés C-15 a montré une inhibition d'environ 60% dans l'ordre du micromolaires. La visualisation des positions de C-15 dans le docking montre des liaisons hydrogènes potentiellement favorables et des liaisons van der Waals avec le site actif de l'AAC. Des travaux complémentaires sur les produits dérivés du C-15 est hautement souhaitable et pourrait conduire à des inhibiteurs plus puissants pour AAC. De ce premier composé, d'autres molécules pourraient être conçus en modifiant des groupes chimiques qui permettraient d'améliorer l'interaction avec la protéine. Le design sera guidé par la structure de l'inhibiteur dans le transporteur. Une meilleure compréhension des relations structure activité serait bénéfique pour les travaux sur la cristallisation de complexe AAC-inhibiteur. Le présent travail a conduit à la découverte d'inhibiteurs de petites molécules d'AAC.

# Chapter 1

## Introduction

### 1.1 Transport across biological membranes

Cell membranes are crucial to the life of the cell. The plasma membrane encloses the cell and defines its boundary. Inside the eukaryotic cell along with plasma membrane, membranes of other organelles including Golgi apparatus, mitochondria and endoplasmic reticulum maintain the characteristic difference between content of each organelle and the cytosol. Hydrophobic architecture of the lipid bilayer of cell membranes prevents the passage of polar molecules on their own. This barrier allows the cell or specific organelles to maintain concentration of solutes in cytosol or their respective fluids. However such barrier requires specific mechanisms to transfer lipid insoluble molecules and ions across the membrane in order to ingest essential nutrients, excrete metabolic waste products and regulate intracellular ion concentration. To transport small water soluble organic molecules and inorganic ions specialized transmembrane proteins are utilized. Some specialized mammalian cells such as intestinal cells can devote about two third of their energy consumption on membrane transport, which reflects the paramount importance of the process.

### 1.1.1 Principle of membrane transport

The rate of diffusion for any molecule across the lipid bilayer depends partially on its size and mainly on its relative solubility in lipid. In general, the smaller the molecule and more soluble it is in the oil, faster it moves across the membrane. Small molecules such as  $O_2$  and  $CO_2$  rapidly diffuse across the bilayer whereas small uncharged polar molecules such as water and urea also diffuse across the bilayer, albeit much slowly. On the other hand bilayer is impermeable to charged inorganic molecules. The charge and high degree of hydration of these molecules prevent them to be transported naturally, in fact synthetic bilayers are  $10^9$  times more permeable to water molecules than small charged molecules such as  $Na^+$  and  $K^+$  (see fig. 1.1). Another factor that affects diffusion of the molecules across the membrane is difference in their concentration on the two sides of the membrane. Multiplying this concentration difference by the permeability coefficient gives the flow rate of the molecules across the membrane.

To transport naturally impermeable molecules such as ions, sugars, amino acids, nucleotides and other metabolites, membrane transport proteins are employed by the cells. Membrane transport proteins provide a continuous protein path that allows the specific molecule to pass through lipid bilayer without directly interacting with it. Transporters (also known as carriers) and channels are the two major classes of membrane transport proteins. Upon binding to the substrate transporters, undergo large conformational changes and facilitate transport of the molecule. On the other hand, channels form pores that extend across the lipid bilayer and these pores can be opened by a variety of mechanisms. When open, most of the pores interact with solute and undergo relatively small conformational changes and allow the solute to pass through membrane. Due to generally large conformational changes associated with transporters, solute transport by them is usually slower than channel-mediated solute transport. Transport mediated by both kinds of proteins can be either passive or active (see

fig. 1.2).

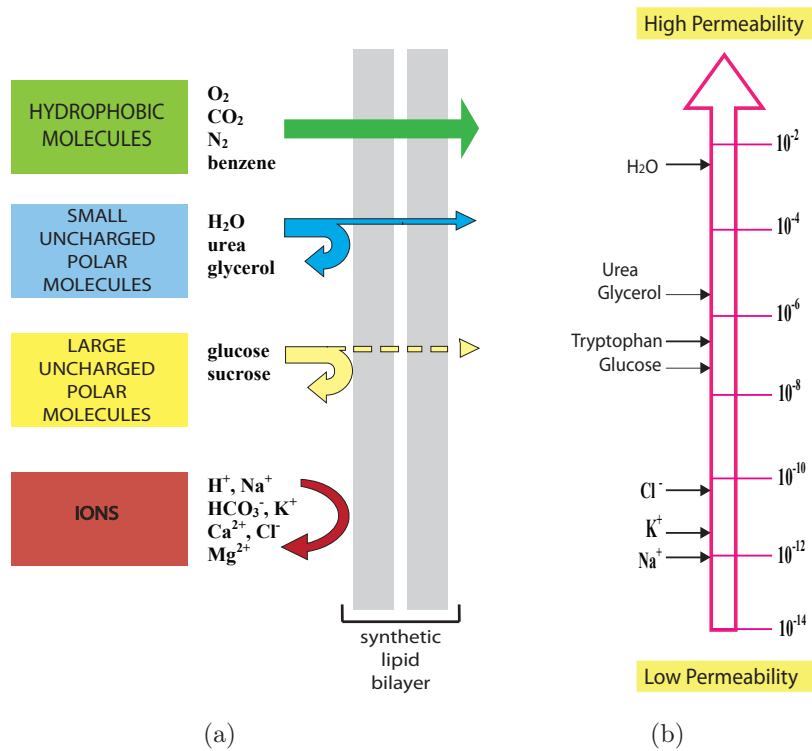


Figure 1.1: (a) Schematic diagram showing relative permeability of molecules across a synthetic lipid membrane. Molecules with small size and more importantly with high tendency to solubilize in lipids, move faster across the membrane. (b) Permeability coefficients of various molecules for the passage through synthetic lipid bilayer. Adapted from Molecular biology of cell (Alberts et al., 2005).

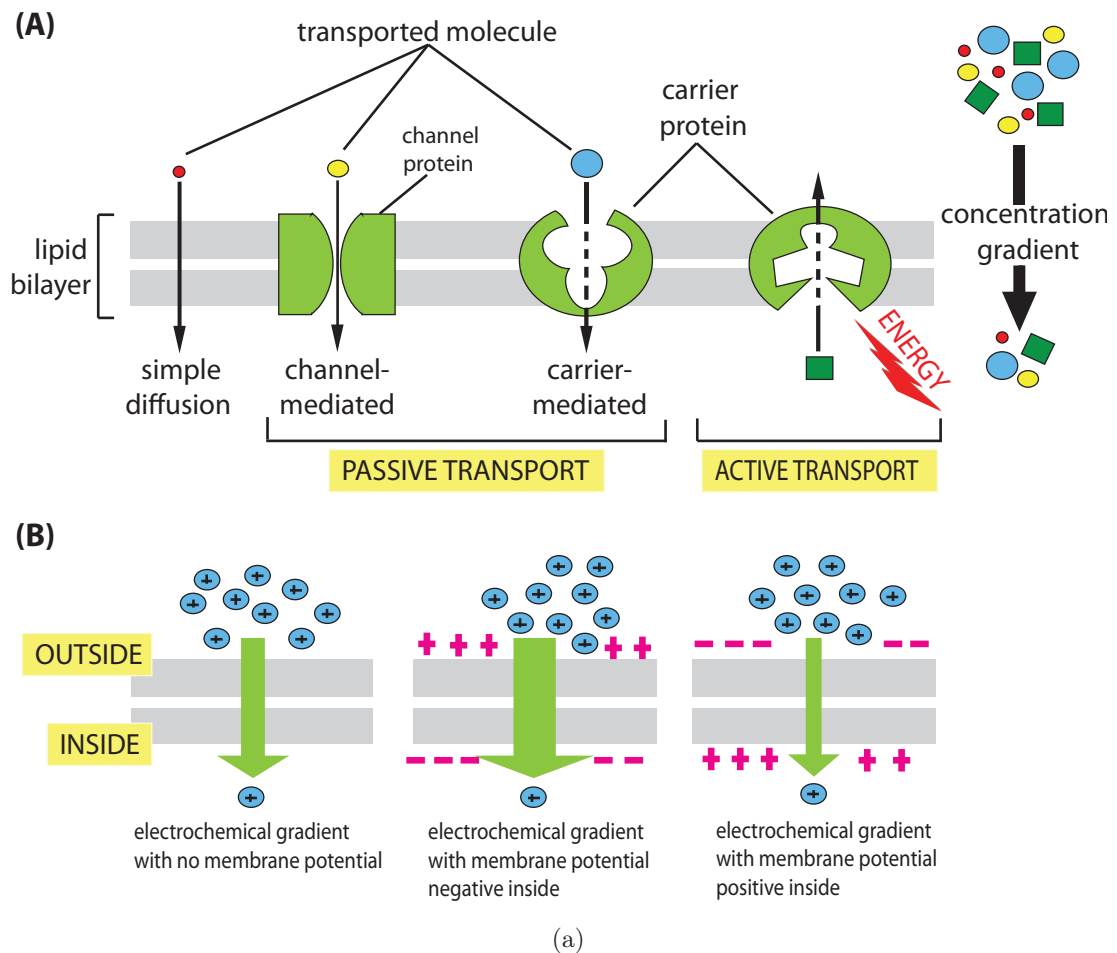


Figure 1.2: (a) Passive transport of molecules can occur either by simple diffusion through the lipid bilayer or by facilitated diffusion through channels and passive transporters. In contrast, active transporter utilizes energy to pump solutes against their concentration or electrochemical gradient. (b) Combination of electrochemical gradient with membrane potential forms electrochemical potential, which guides the solute transport; it can be additive (middle) or it can be subtractive in nature (left). Adapted from Molecular biology of cell (Alberts et al., 2005).

## 1.2 Adenine nucleotide transport

Among all the metabolites, nucleotides are of pivotal importance due to their energy storing capacity in the form of ATP and GTP. Nucleotides, apart from being the universal energy currency, also constitute the core component of all forms of genetic information material. Due to both by size and charge, adenylate nucleotides do not cross biomembranes freely, making the involvement of specific transporter proteins necessary for their transport. Oxidative mitochondrial metabolism and associated nucleotide transport have been studied extensively, however our knowledge of nucleotide transport across other membrane bound organelles is still rudimentary. In the past, it was assumed that adenine nucleotide transport in cells mainly takes place at the mitochondrial membrane. However, in recent years an increasing number of studies have shown that the majority of cellular membranes contain adenine nucleotide transport systems (see figure 1.3) [Mayinger *et al.*, 1995, Abeijon *et al.*, 1997]. Based on transmembrane (TM) helices predictions and sequence homology, nucleotide transporters can be divided into two broad categories, as shown below.

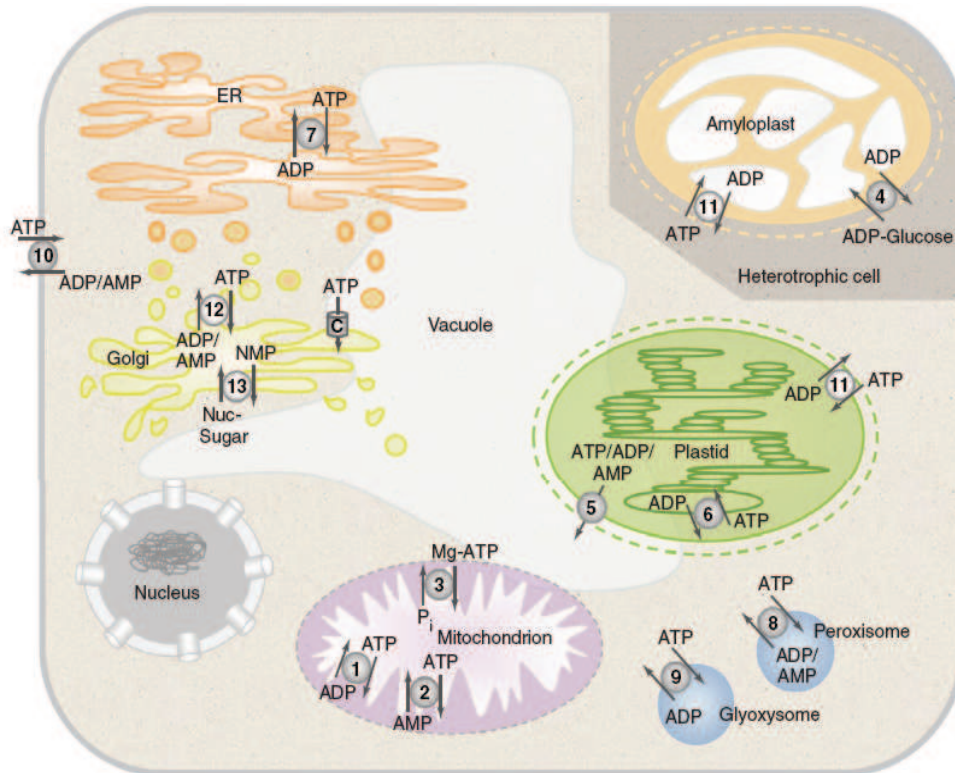


Figure 1.3: Occurrence of adenine nucleotide transporters in various membrane-bound organelles. The ATP/ADP carrier (1), the ATP/AMP carrier (2) and the ATP-Mg/Pi carrier (3) are located in the inner mitochondrial membrane and represent typical members of the mitochondrial carrier family (MCF) (depicted as gray spheres). Apart from mitochondria, MCF carriers are widespread in other organelles such as the ADP-glucose importer (4) residing in the inner envelope membrane of heterotrophic plastids, thylakoid-located ATP/ADP carrier (6) and the ATP/ADP carrier from plant ER (7) as well as the adenine-nucleotide carriers from peroxisomes (8) and glyoxysomes (9) and of the plasma membrane (10). Adenylate carriers other than MCF (depicted in white spheres) are also found in some organelles e.g.. the ADP/ATP carrier at inner chloroplast membrane (11), nucleotide carrier (12) and nucleotide-sugar carrier (13) of Golgi complex. Adapted from [Haferkamp *et al.*, 2011].

### 1.2.1 Mitochondrial localized adenylate transporters

The transport of metabolites across the inner mitochondrial membrane is carried out by a family of proteins called Mitochondrial Carriers (MCF). These carriers link the biochemical pathways of the cytosol and the mitochondrial matrix by transporting metabolites, nucleotides, inorganic ions and cofactors across the mitochondrial inner membrane. Mitochondrial carriers share a common structure consisting of around 300 amino acids and contain three homologue repeats of around 100 amino acids. Each of the repeat is predicted as two TM helices. Despite a low sequence conservation, a consensus sequence, P-X-(D/E)-X-X-(K/R)-X-(K/R)-(20-30 residues)-(D/E)-G-X-X-X-X-A-(K/R)-G<sup>1</sup> is found in all the members [Saraste & Walker, 1982]. To date, nine human diseases have been found to be caused by defects in mitochondrial carriers (Palmieri *et al.*, 2008). All the carriers located at the inner membrane of mitochondria are specific for selective metabolite transport whereas outer membrane of mitochondria harbors several pores (i.e. VDAC<sup>2</sup>) that allow a rather non specific transport of diverse small molecules. This process of differential transport allows accumulation of several ions and metabolites at intermembrane space (IMS), eventually depending on the metabolic demand they are being imported or exported.

A subgroup of carriers transport adenine nucleotides and related compounds, such as thiamine pyrophosphate, FAD, NAD, coenzyme A and pyrimidine nucleotides. Mitochondria being the powerhouse of cell generates ATP by the process of oxidative phosphorylation. ATP generation is fueled by the substrate ADP and phosphate, which enter inside the organelle and regenerated ATP must leave from matrix to outside. Export of this neo-synthesized ATP by counter exchange of cellular ADP is carried

---

<sup>1</sup>Where A is an aromatic residue

<sup>2</sup>VDAC is a voltage-dependent anion-selective channel that act as a general diffusion pore for small hydrophilic molecules



out by a MCF member: the ADP/ATP carrier (AAC) (see fig. 1.4). AAC is one of the most abundant carrier in mitochondrial inner membrane and by ATP transport the carrier supplies energy from mitochondria to cytosol and subsequently to other organelles [Klingenberg, 2008, Nury *et al.*, 2006].

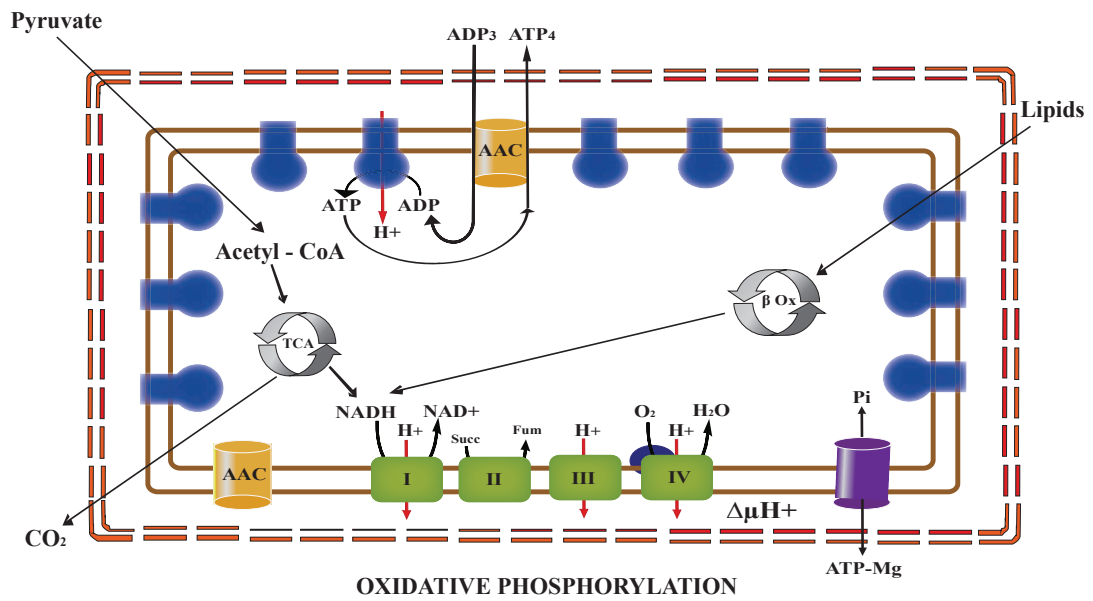


Figure 1.4: Schematic representation of the mitochondrial adenylate carriers and their physiological implication on oxidative phosphorylation process. The NADH generated by lipid oxidation ( $\beta$ -oxidation) and in the Krebs cycle (TCA) is oxidized by the respiratory chain complexes (complexes I, II, III, and IV in green, cytochrome C in blue), and protons are pumped to the intermembrane space. The proton electrochemical gradient is used by the ATP synthase to generate ATP from ADP and phosphate (Pi). The ATP generated is transported to the cytosol in exchange for ADP through the ADP/ATP carrier (AAC). Another adenylate carrier ATP-Mg/Pi catalyzes electroneutral transport; the direction of ATP-Mg and Pi transport is dependent on their relative concentration across the membrane.

Apart from AAC two more adenylate carriers are located in mitochondrial inner membrane. One of them is ATP-Mg/Pi carrier, that carries out an electroneutral exchange of ATP-Mg<sup>2+</sup> for HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, between the cytosol and mitochondrial matrix and thus contributes to the net uptake or net loss of adenine nucleotides [Traba *et al.*, 2009, Aprille, 1993]. The direction and magnitude of net adenine nucleotide transport is dependent on the relative ATP-Mg and Pi concentrations in the mitochondria. The ATP-Mg/Pi carrier is insensitive to classical AAC inhibitors carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid (BA). Another identified adenylate mitochondrial carrier is AMP/ATP carrier, albeit found only in plant mitochondria. Its primary function is probably to catalyze the exchange between cytosolic AMP and intra mitochondrial ATP (Palmieri *et al.*, 2008). f

### 1.2.2 Adenylate transporters in chloroplast

Like mitochondrion membrane, plastid membrane is also formed by two significantly different membranes. The outer membrane harbors various pores (porins) whereas inner envelope membrane forms a metabolic barrier between cytosol and chloroplast stroma, therefore contains most of the active transporters. Thylakoids that reside in the chloroplast stroma, further extend the compartmentalization by forming third chloroplast membrane. Thylakoid membrane is the site of photosynthesis and contains several metabolite transporters. Thylakoids contain chlorophylls, the complete photosynthetic electron transport chain and the ATP synthase, which is required for ATP regeneration on the stroma side.

The first information of adenine nucleotide transport across chloroplast inner membrane was obtained by import measurements on intact chloroplast from the algae *Acetabularia mediterranea* [Heldt, 1969, Strotmann & Berger, 1969]. Roughly 30 years later an *Arabidopsis* transporter protein family NTT (see fig. 1.5) was found responsible for the adenine nucleotide transport [Kampfenkel *et al.*, 1995, Neuhaus & Emes, 2000]. NTT family is a small

family and all the known NTTs strictly transport ATP and ADP only. These transporters functionally and phylogenetically differ from mitochondrial AAC. Members of this family have been predicted to contain 11-12 TM helices. [Neuhaus & Emes, 2000].

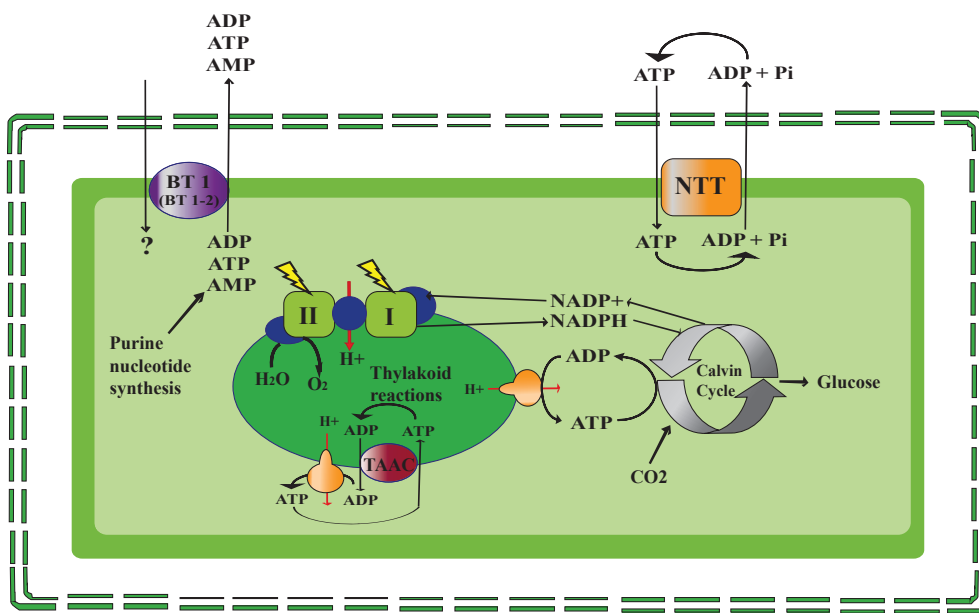


Figure 1.5: Graphical presentation of all the chloroplast adenylate carriers. Adenine nucleotide carriers (NTT) located at the inner envelope, exchange cytosolic ATP for chloroplast ADP and Pi, and this ATP is used for night reactions, including synthesis of lipids and starch. The thylakoid adenine nucleotide carriers (TAAC) exchange stroma ATP (generated by photophosphorylation in the plastid ATP synthase) for thylakoid ADP, and this ATP is used for thylakoid reactions. The ubiquitous BT1 (BT1-2) transporter exports adenine nucleotides, which are exclusively synthesized *de novo* in plastids, to the cytosol.

One of the NTT members in chloroplast, NTT1 mediates catalysis of ATP import by the counter exchange of ADP and Pi, thus provides energy to the chloroplast. Another adenylate transporter in *Arabidopsis* is Brit-

tle1 (AtBT1), which acts as a uniporter and known to transport ADP, AMP and ATP across the inner chloroplast membrane [Kirchberger *et al.*, 2008, Sullivan & Kaneko, 1995]. AtBT1 is a member of MCF, which provides adenine nucleotides, exclusively synthesized *de novo* inside plastids to the cytosol and other organelles. At the thylakoid membrane one more adenylate carrier thylakoid AAC (TAAC) is located that allows exchange of ATP inside the thylakoid by ADP exchange to the stroma [Thuswaldner *et al.*, 2007]. TAAC, links stroma adenylate pool to thylakoid, which catalyzes ATP-dependent process including protein phosphorylation, folding, import and degradation [Thuswaldner *et al.*, 2007].

## 1.3 Mitochondrial AAC

### 1.3.1 Physiological role and location of the carrier

Membrane potential across the inner membrane regulates the AAC mediated exchange of ATP versus ADP between the matrix space and the cytosol (Heldt *et al.*, 1972). This process is the last step of oxidative phosphorylation and the energy generated by the process is supplied to the cytoplasm. An important characteristic of the carrier is that, due to counter exchange, it is unable to modify the net content of adenine nucleotides. Therefore ADP is always available for mitochondrial ATP generation machinery and along with phosphate carrier, the carrier maintains the metabolite pool for energy generation. The affinity of the AAC for ADP or ATP is high with  $K_m$  of around 2  $\mu$ M in yeast and 4-8  $\mu$ M in humans [De Marcos Lousa *et al.*, 2002].

Three isoforms of bovine AAC have been identified [Powell *et al.*, 1989], whereas in humans 4 isoforms of the AAC have been reported [Stepien *et al.*, 1992, Skárka *et al.*, 2003]. Existence of these isoforms could be correlated with adaptations of the functional parameters to the particular tissue needs. One of the human isoforms hAAC1 is exclusively expressed in muscles and its

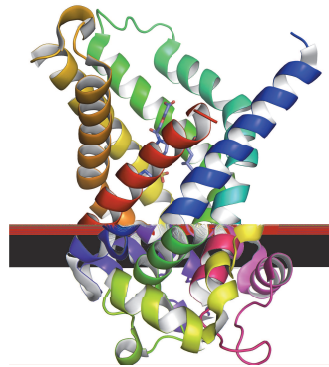
expression is induced during myoblast differentiation [Stepien *et al.*, 1992]. hAAC2 expression is strongly stimulated by growth factor in fibroblasts [Ku *et al.*, 1990] and also increased in neoplastic cells (Heddi *et al.*, 1996). AAC3 is highly expressed in cancer cells (Li *et al.*, 1989; Powell *et al.*, 1989), whereas hAAC4 is expressed at low levels and is confined to liver and testis, marginally to brain [Dolce *et al.*, 2005].

Pathophysiological role of the carrier has been studied by knock-out mutations in mice. Transgenic mice lacking mAAC1 showed characteristics of mitochondrial myopathy and cardiomyopathy [Graham *et al.*, 1997]. While mAAC2 inactivation was found lethal before birth [Kokoszka & Coskun, 2001]. The high expression of hAAC3 in tumor cells has been proposed as conductive for maintaining membrane potential despite the glycolytic activity of this particular cell type [Chevrollier *et al.*, 2005]. Several studies have indicated a potentially important role for AAC in programmed cell death [Kroemer & Galluzzi, 2007].

### 1.3.2 Structure of carrier

Three dimensional structure of the bovine AAC isoform1 was the first among entire family [Pebay-Peyroula *et al.*, 2003]. Since most of the family members are expected to contain similar structure, this structure has improved the understanding of metabolites transport to a great extent. The backbone of AAC appears in canonical shape, closed toward the matrix and opened widely toward the IMS. The backbone also exhibits a pseudo-threefold symmetry consistent with the triplicated sequence of the gene. The overall architecture of AAC consists of six TM helices labelled H1 to H6, connected by three loops M1 to M3 on the matrix side and two loops C1 and C2 on the IMS (see fig. 1.6) . Matrix loops are partially structured and contain short amphipathic helices (labelled h1-2, h3-4, and h5-6) spanning over 12 residues. The prolines of odd-numbered TM helices kink helices, bringing the C terminal ends together at the base of the cavity. Infact all

the six TM helices are also tilted with respect to the membrane plane.



ERROR: IOError  
OFFENDING COMMAND: image

STACK:

-mark-  
-savelevel-